云 南 植 物 研 究 8（2）：181—192，1986
Acta Botanica Yunnanica

马槟榔甜味蛋白的研究Ⅳ．稳定性和变性

丁 鸣* 胡 忠

（中国科学院昆明植物研究所）

摘要 通过对马槟榔甜味蛋白Ⅰ和Ⅱ热变性试验，发现MaⅠ在80℃水浴中很快失甜味；圆二色谱证明其主链构象中的α螺旋几乎全部消失了。但 MaⅡ却能经受长时间保温而不失去甜味；电泳行为亦不发生改变。

在盐酸胍和尿素变性试验中发现，随变性剂浓度加大，蛋白质荧光发射光谱中色氨酸峰发生红移，直至蛋白质发生完全变性为止。以此为指标发现在酸性条件下，马槟榔甜蛋白更稳定；一般情况下3—5 *M*的盐酸胍就足以使它变性；但即使是8 *M*的尿素也不能使它完全变性。此和横向变性剂梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果是一致的。当脱掉8 *M*尿素或—6 *M*盐酸胍-MaⅠ溶液中的变性剂后，MaⅠ的甜味可恢复，其二级结构及电泳行为只发生微小的变化。

MaⅠ在SDS聚丙烯酰胺电泳分析中出现了一条双分子聚合体带，但将MaⅠ热变性、还原变性或羧甲基化等后，随MaⅠ甜味的消失，这条聚合体带也消失了。MaⅡ在任何情况下均不出现上述现象，因此认为这条带的形成与MaⅠ本身和甜味相关的一种特殊结构有关。

关键词 马槟榔；甜味蛋白；变性

我们曾报道马槟榔（*Capparis masaikai* Lévl.）种子的主要贮存蛋白是能引起甜味的二种碱性蛋白MaⅠ和MaⅡ[1，2]。作为一种新型甜味剂，甜味蛋白质的应用前景良好[5]。与糖类甜味剂相比，它既是非热源物质，也不易为微生物生长的基质。但因为蛋白质稳定性一般较差，因此，稳定性如何则成为衡量某种蛋白甜味剂实用价值的重要指标之一。此外，甜蛋白变性的各种试验，也为认识甜味与蛋白质结构之间的关系提供了线索。本文报告热和变性剂尿素，盐酸胍及SDS的处理对马槟榔甜蛋白的甜味和结构的影响。

材料与方法

1.马槟榔甜蛋白的分离提取

用贮存于冰箱（＋8℃）中的马槟榔种子经去皮、磨碎，用石油醚脱脂二次，然后用50％丙酮提取，离心去除残渣。上清液直接上羧甲基纤维素（英国 Whatman 产品）

本文于1985年8月31日收到。

* 丁鸣是本所一九八五届硕士研究生。生理室Ti质粒组和仪器组在仪器和药品使用上提供方便，一并致谢！

柱（25×φ2.5 cm），然用后重蒸水，0.2M、0.45M、0.6M NaCl溶液分部洗脱，流出液用核酸蛋白检测仪在280 nm 处检测。分别收集0.45M和0.6 M NaCl 液处的洗脱峰，经DIAFLO YM 5 超滤膜（美国Amicon 产品）浓缩并脱盐，如此重复三次，最后将浓缩样置于4 °C中对重蒸水透析24小时，然后冰冻干燥即可。

2.聚丙烯酰胺凝胶电泳及胶板扫描

采用pH 4.3—15%的不连续凝胶缓冲系统[9]。堆积胶浓度3%；电泳板规格为10×10 cm；电泳条件是≤10°C，110 V恒压，电泳10—12小时。电泳完毕后，用含考马斯亮兰G-250的甲醇染色固定液固定染色过夜，然后用乙醇-乙酸-水脱色液脱色至背景清晰为止。在岛津 CS-910双波长为薄层扫描仪上用透射光对凝胶板进行扫描。扫描波长为595 nm；参考波长为 440 nm。并经机附数据处理机对吸收峰进行积分，求得每个色带所占的相对比例。

3.热变性试验

调节水浴锅温度为80±0.5°C，将浓度为 5 mg/ml 的蛋白质溶液放入保温。记录保温时间，到时取出冷至室温后再进行分析。

4.尿素和盐酸胍变性试验

分别配制 1 — 6 M盐酸胍-磷酸缓冲液（0.01 M，pH 7.0）和 1 — 8 M 尿素-磷酸缓冲液（0.01M，pH 7.0），用磷酸和氢氧化钠调节溶液的pH到所需要的值；或直接溶解变性剂到0.01N乙酸中。最后加入蛋白质样品，在室温下放置4小时左右即用来分析。

5.荧光光谱的记录

用日立850型萤光分光光度计记录萤光发射光谱。调节连接恒温水浴的恒温池架温度至20±0.2°C，记录校正光谱。激发光波长为260 nm；激发光和发射光狭缝均为5 nm；扫描速度为60—100 nm/min。

6.横向变性剂梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用pH 4.3缓冲系统[9]，用做梯度胶的方法做成 0 — 8 M（15%—11%）的横向尿素梯度聚丙烯酰胺凝胶板。从与变性剂梯度相垂直的方向，在LKB多用水平板电泳仪上进行电泳[6]。电泳条件为室温下，恒流20 mA，电泳5小时。电泳板规格10×10 cm。

7.圆二色谱的记录

在法国 J. Y. Dichrographe Ⅱ上记录圆二色谱。样品溶解于重蒸水中，浓度为4 mg/ml；光程为0.001 cm；扫描速度为60 nm/min；灵敏度为 5×10^{-6}；所有图谱均经计算机累加4次并平滑。

8.用凝胶过滤法测定 Ma Ⅰ 的分子量

采用Sephacryl S-200（Pharmacia产品）为柱基质，柱规格为63×φ 1 cm。装柱后，用0.2N碳酸氢铵溶液充分平衡凝胶柱24小时，即可上样层析，并用同液洗脱。流速为15 ml/小时，通过核酸蛋白检测仪在280 nm处进行检测。用蓝色葡聚糖(Pharmacia产品）作为前沿指示剂；并用牛血清白蛋白（Sigma产品，MW66200），大豆胰蛋白酶抑制剂（Sigma产品，MW21500），核糖核酸酶A（上海生化所产品，MW 13700）作为

分子量测定的标准蛋白。层析时间约为6小时。

9.垂直板型SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用15%-pH 8.8 的不连续缓冲凝胶系统[8]。堆积胶浓度3%。胶板规格为10×10 cm。电源条件为110V恒压；全部电泳过程均在室温下进行。

样品液采用0.05*M* Tris-HCl，pH 6.8缓冲液；其中含1% SDS，2%β-巯基乙醇，10%甘油。电泳前用此样品液将2 mg/ml 的样品稀释一倍，然后在沸水中加热1分钟，放置至冷即可使用。

用于SDS电泳分析的样品有下列几种：

（1）正常MaⅠ和MaⅡ样品。（2）热变性MaⅠ样品。（3）还原变性后的MaⅠ样品。即用8*M*的尿素或6*M*的盐酸胍和50倍蛋白质克分子浓度的二硫苏糖醇-磷酸缓冲液（pH 7.0，0.01*M*）对蛋白质进行还原变性。经充氮气封口后，在室温下放置24小时，然后在低温下（4°C）透析24小时以上，经Sephadex G-75柱层析后即用于分析。（4）羧甲基化MaⅠ样品。即经上述还原变性后的蛋白样品，未透析前再加入所使用的还原剂巯基克分子数50倍的碘乙酸，在室温下pH 8.4的磷酸缓冲液中搅拌2小时，然后在冰浴中冷却，以终止反应。最后放入透析袋中，在4°C下充分透析24小时以上，再经Sephadex G-75柱层析分离。（5）梯度含盐量样品。制备含氯化钠0.025，0.05，0.1，0.15，0.20，0.30，0.40*M*的MaⅠ样品，用于SDS电泳分析。

10.脱变性剂

采用Sephadex G-25柱层析或在低温（4°C）下透析的方法，脱去含6*M*盐酸胍和8*M*尿素 MaⅠ样品中的变性剂，然后冰冻干燥制成干粉。用此来进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和CD谱的分析，并尝试其甜味是否存在。

结　　果

1.热变性

根据胡忠等人以前的报道，分别将0.6*M* 氯化钠液洗脱峰和0.45*M* NaCl 洗脱峰称为MaⅠ和MaⅡ。从电泳和扫描的结果来看，仅含有少量杂质，基本上达到了电泳纯（图1）。

热变性试验表明MaⅠ的水溶液在80°C中30分钟以内即发生变性。将处理后的MaⅠ液上CM-纤维素柱分析，用0.1*N*—1*N* NH_4OAc 溶液线性梯度洗脱，结果如图2。此中得到的主要成份DM-1失去了甜味。与原MaⅠ相比，从离子交换柱上洗脱所需的盐浓度降低；电泳行为发生了显著的变化（图1），相对迁移率变小。另外从热变性产物中还分离得到了少量的DM-2和DM-3。

从DM-1远紫外区域圆二色谱来看，与用Yang和Chen 的方法[3]计算得到的结果一样，均表明原来蛋白质分子所具有的α-螺旋结构基本上全部消失了（图3）。

与MaⅠ不同，MaⅡ水溶液在80°C下经过12、24、48小时保温以后，甜味仍不消失；而且电泳行为也基本没有发生改变（图4）。

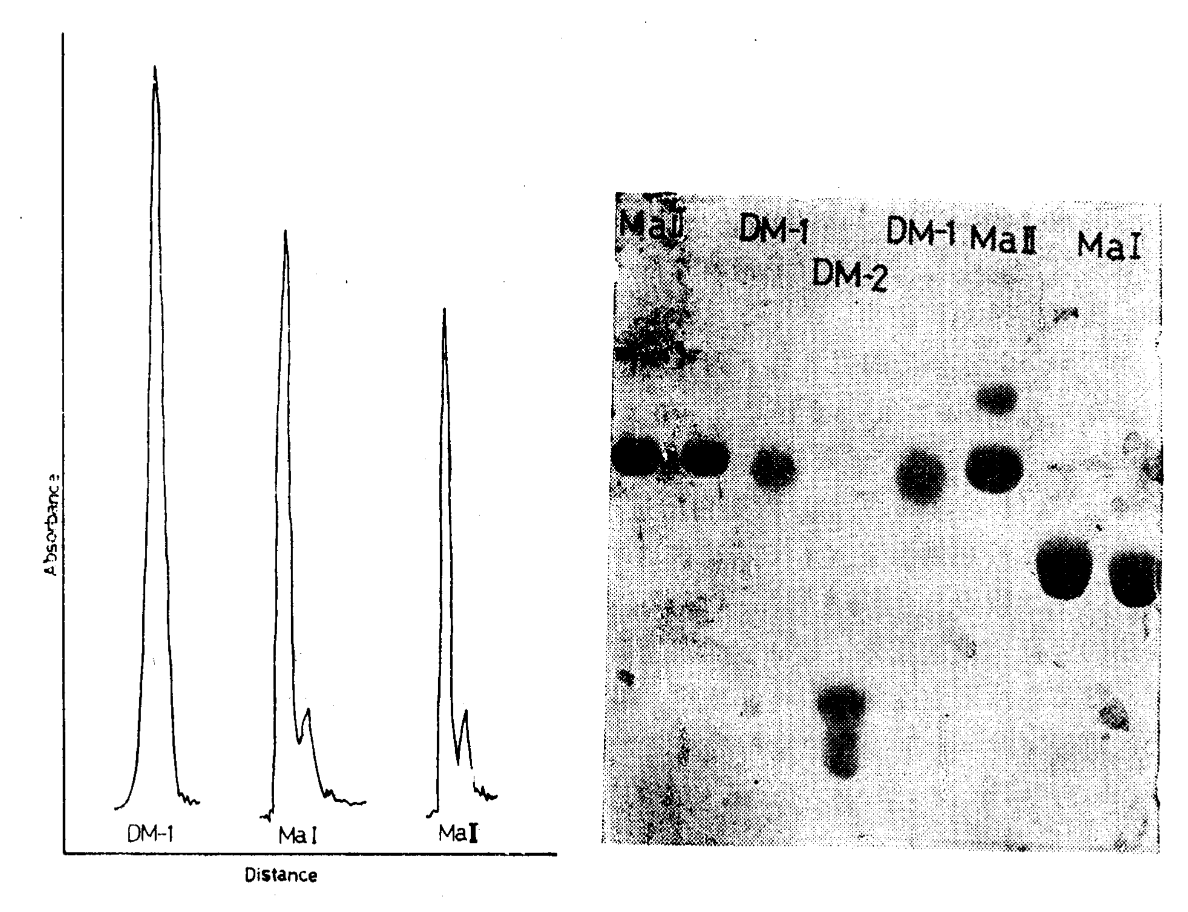


图1． Ma Ⅰ，Ma Ⅱ和 DM-1聚丙烯酰胺凝胶电泳图及扫描曲线 电泳采用pH 4.3—15% 的不连续凝胶缓冲系统。扫描波长为595 nm；参考波长为440 nm。DM-1和DM-2是热变性后的Ma Ⅰ经 CM-C柱层析分离后得到的不同组份。

Fig. 1. PAGE pattern and scanning diagram of Ma Ⅰ, Ma Ⅱ, and DM-1. Electrophoresis was carried out in pH 4.3 discontinue buffer system and 15% gel. Scanning wavelength 595 nm; reference wavelength 440 nm. DM-1 and DM-2 are different fractions from thermodenatured Ma Ⅰ after CM-C chromatography.

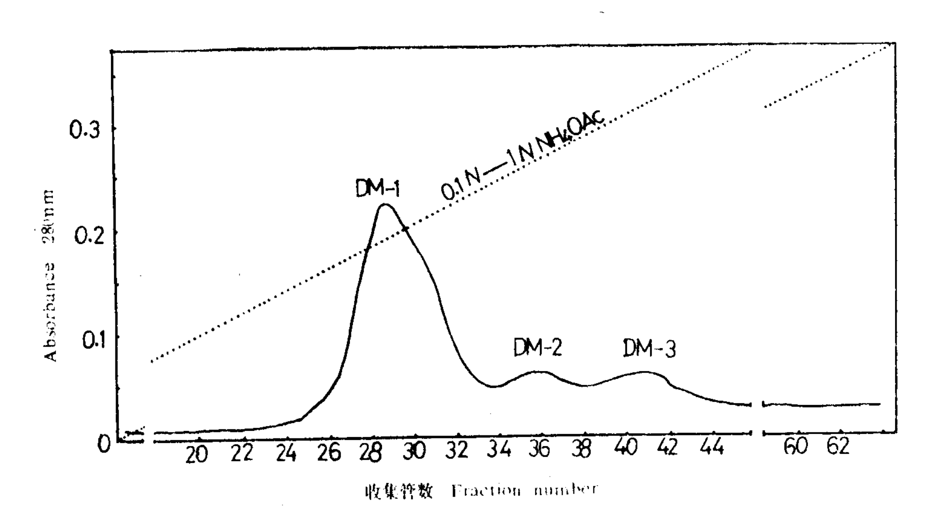


图2． 热变性后的Ma Ⅰ CM-纤维素柱层析分离的洗脱曲线

Fig. 2. Chromatography of thermodenatured Ma Ⅰ on CM-Cellulose column.

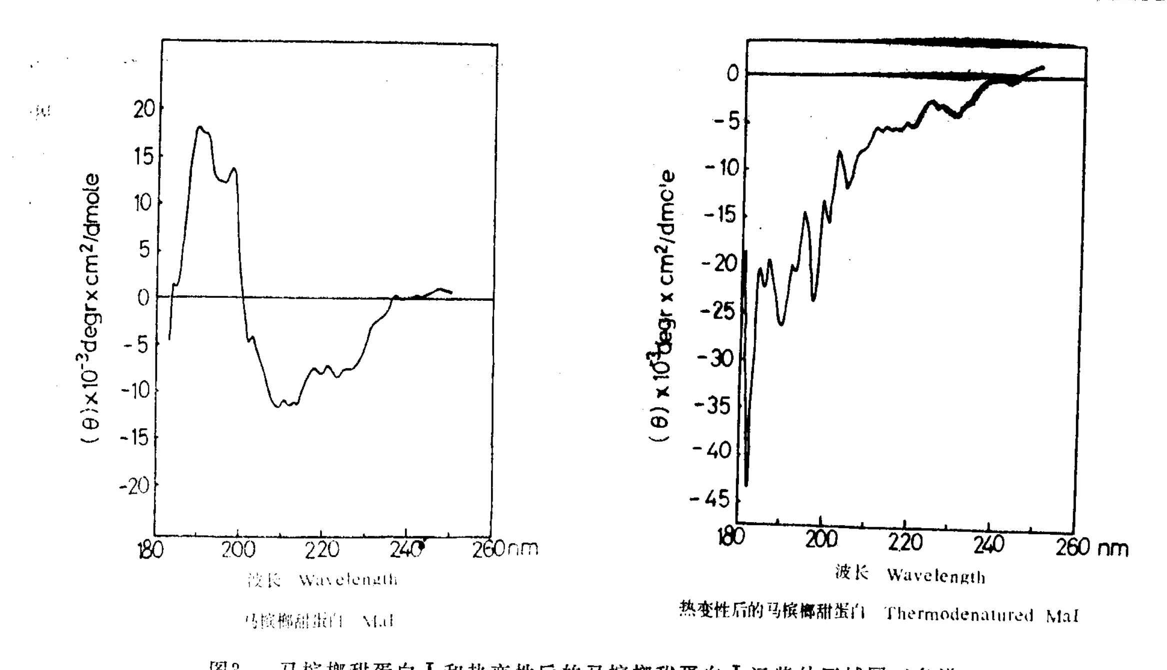


图3. 马槟榔甜蛋白Ⅰ和热变性后的马槟榔甜蛋白Ⅰ远紫外区域圆二色谱

Fig. 3. CD spectra of native Ma Ⅰ and thermodenatured Ma Ⅰ in the far ultraviolet.

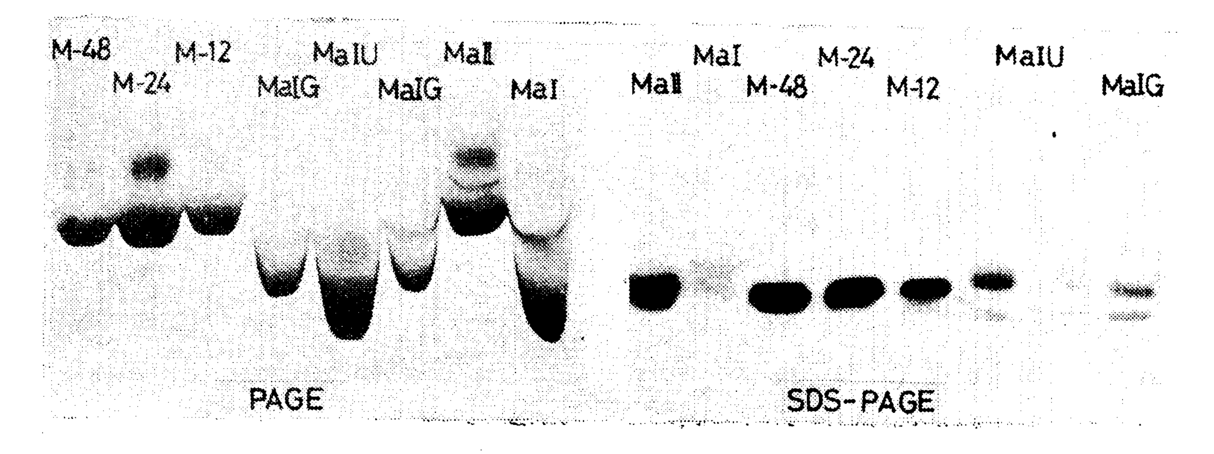


图4. 热处理后的MaⅡ和用变性剂处理并脱掉变性剂后的MaⅠ聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）和SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

MaⅠG 表示用盐酸胍处理后脱掉盐酸胍的MaⅠ样品。

MaⅠU 表示用尿素处理后脱掉尿素的MaⅠ样品。

M-12，M-24和M-48分别表示经过12，24和48小时热处理（80℃）后的MaⅡ样品。

Fig. 4. PAGE and SDS-PAGE pattern of heat-treated (80℃)MaⅡ and denaturants-treated MaⅠ after removing denaturants.

MaⅠG means Gdn-HCl-treated MaⅠ after removing Gdn-HCl.

MaⅠU means urea-treated MaⅠ after removing urea.

M-12, M-24 and M-48 mean MaⅡs after 12, 24 and 48 hours incubation at 80℃ respectively. The conditions for PAGE are same as showm in Fig. 1; the conditions for SDS-PAGE are described in the paper.

2.尿素和盐酸胍的变性作用

在盐酸胍变性试验中我们发现，在一定浓度的变性剂中，Ma Ⅰ和Ma Ⅱ的色氨酸蛍光发射峰的位置均发生显著的红移（图5，图6）。进而又发现，红移的程度，与变性时间的长短无关，而与盐酸胍浓度呈显著的正相关。当盐酸胍浓度达到一定值时，红移即停止，即使盐酸胍浓度再增大，红移也不再增加（表1），这表明色氨酸萤光发射峰的红移可能是蛋白质变性的指标[4]。

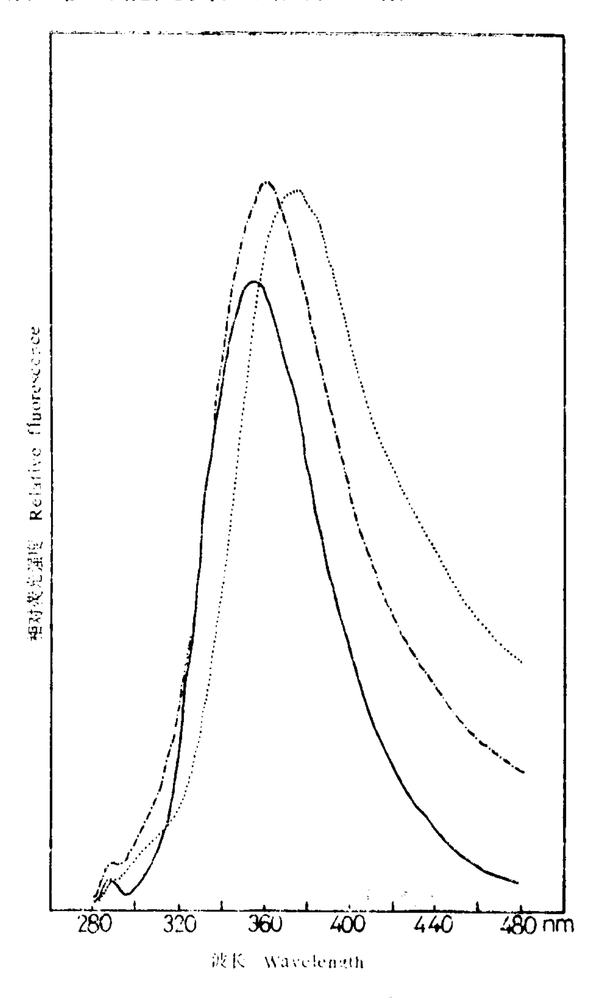


图5. 马槟榔甜蛋白Ⅰ荧光发射光谱
纯蛋白质溶液——；在8 M尿素溶液中—·—·—；在6 M盐酸胍溶液中……。
Fig. 5. Fluorescence emission spectra of Ma Ⅰ
native——; in 8 M Urea—·—·—; in 6 M Gdn-HCl……

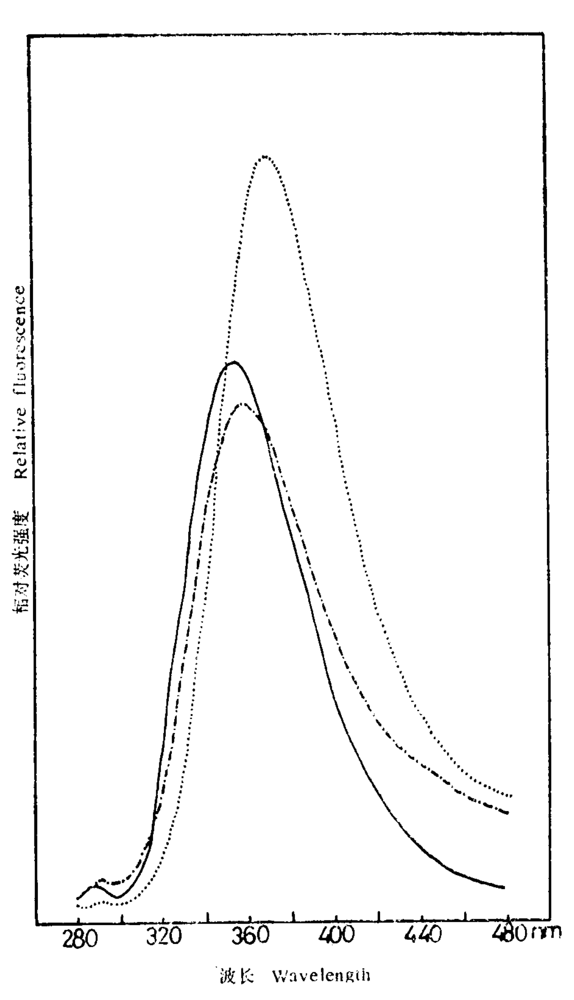


图6. 马槟榔甜蛋白Ⅱ荧光发射光谱
纯蛋白质溶液——；在8 M尿素溶液—·—·—；在6 M盐酸胍溶液中……。
Fig. 6. Fluorescence emission spectra of Ma Ⅱ
native——; in 8 M Urea—·—·—; in 6 M Gdn-HCl……

表1结果还表明，溶液的pH值明显影响变性程度，在酸性条件下，二种甜蛋白都比碱性条件下稳定。

以红移为指标可看出，尿素对甜蛋白的变性作用远较盐酸胍为弱，8 M尿素在上述应试pH范围均不能使甜蛋白变性（表1）。

表1．在不同浓度的变性剂中马槟榔甜蛋白荧光发射峰的波长

Table 1. Fluorescence emision peak wavelength of mabinlin in different concentrations of denaturants

溶　液 Solution	盐酸胍浓度 Concentration of Gdn-HCl (M)	λ_{max} (nm) Ma Ⅰ	 Ma Ⅱ	尿素浓度 Concentration of urea (M)	λ_{max} (nm) Ma Ⅰ	 Ma Ⅱ
pH 7.0,	1	362	362	2	357	357
0.01M	2	370	364	3	359	357
磷酸缓冲液	3	372	365	4	358	356
Phosphate	4	372	368	5	358	357
buffer	5, 6	372	370	6, 7	360	358
				8	360	359
pH 8.0, 0.01M	1	362	366	2, 3	358	356
磷酸缓冲液	2	366	364	4	358	357
Phosphate	3	372	366	5	358	356
buffer	4, 5, 6	372	370	6, 7, 8	360	358
0.1N	1	360	359	2	356	355
醋　酸	2	362	365	3	357	355
Acetic acid	3	365	368	4, 5	357	356
	4	367	366	6	356	356
	5	368	368	7	358	358
	6	371	369	8	357	357

横向变性剂梯度电泳表明，在整个尿素梯度范围之内，均未见蛋白质电泳带的断裂[6]，也表明很可能 8 M的尿素不能将Ma Ⅰ和Ma Ⅱ变性（图 7 和图 8）。

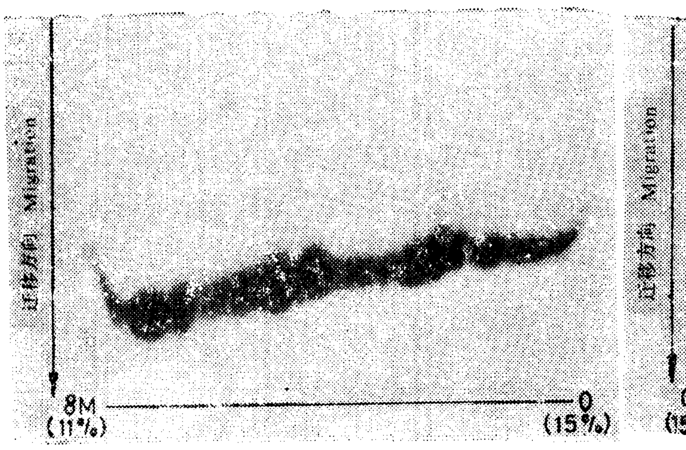


图7．马槟榔甜蛋白Ⅰ横向尿素梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳　线性尿素梯度范围为 0 — 8 M；并采用15—11%的反向凝胶线性梯度来抵消尿素对电泳的影响。

Fig. 7. Transverse urea-gradient electrophoresis of Mabinlin Ⅰ in a gel containing a linear 0—8 M urea gradient, as indicated, superimposed on a slight inverse linear 15—11% acrylamide to compensate the effects of urea on the electrophoretic properties. Other conditions are simslar as shown in Fig. 1.

图8．马槟榔甜蛋白Ⅱ横向尿素梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳　电泳条件同图 7。

Fig. 8. Transverse urea-gradient electrophoresis of Mabinlin Ⅱ All conditions are same as shown in Fig. 7.

盐酸胍对甜蛋白的变性作用是可逆的。用低温透析或凝胶过滤去掉变性剂后，甜蛋白样品仍然有甜味；电泳行为变化不大（图 4）；二级结构基本未变（图 9）。若用尿素处理样品，则上述变化程度更小（图 4，图10）。

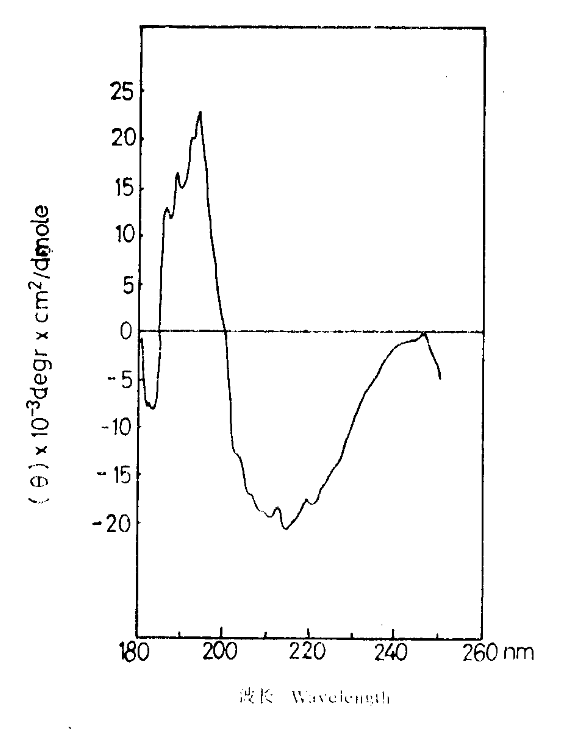


图9. 除去盐酸胍处理样中的变性剂后Ma Ⅰ 的远紫外区域圆二色谱

Fig. 9. CD spectrum in the far ultraviolet of Gdn-HCl-treated Ma Ⅰ after removing the denaturant.

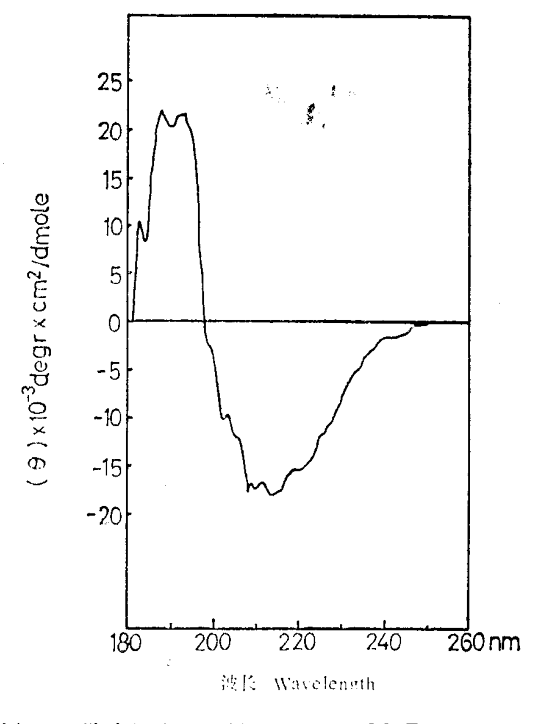


图10. 除去尿素处理样中变性剂后Ma Ⅱ 的远紫外区域圆二色谱

Fig. 10. CD spectrum in the far ultraviolet of urea-treated Ma Ⅱ after removing the denaturant.

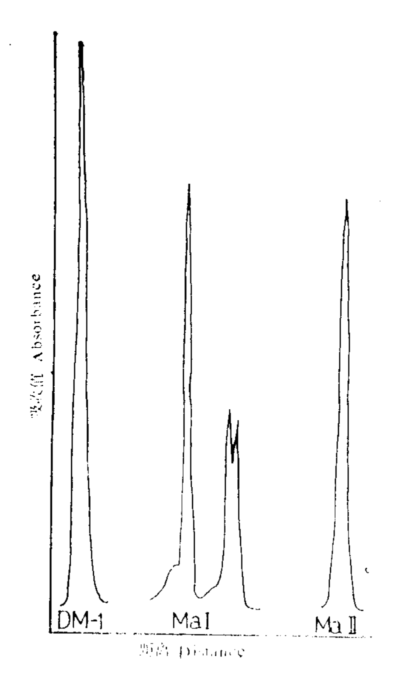
3. SDS的作用

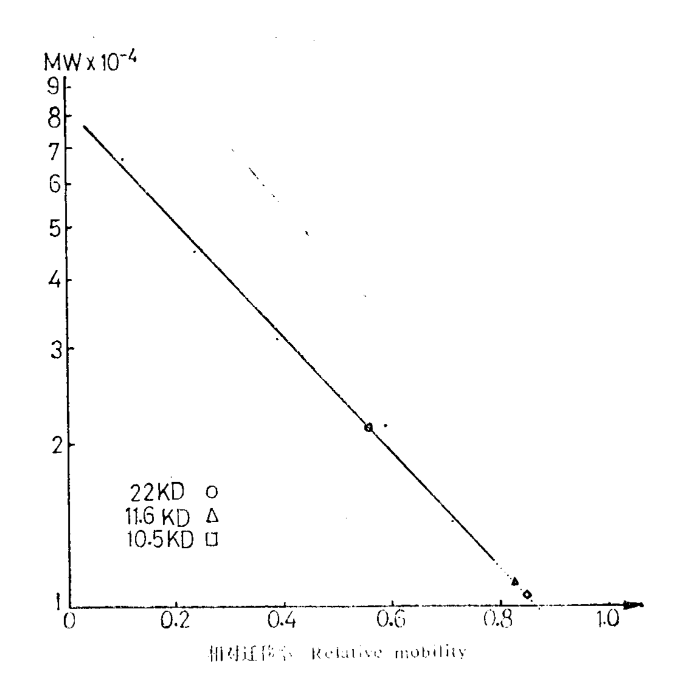
从凝胶过滤柱层析的结果来看，Ma Ⅰ 的Ve为61 ml，而其它标准蛋白质的 Vc 均较此小（表 2），表明Ma Ⅰ 分子量确实为11.6KD；但从SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳来看，除了出现与凝胶过滤结果相对应的11.6 KD带以外，还明显地出现了一条分子量发生加倍的22KD 带，即出现二聚体（图11）。

表2. 不同的蛋白质在Sephacryl S-200凝胶过滤中的洗脱体积

Table 2. Elution volume of different proteins in sephacryl S-200 gel filtration.

蛋白质 protein	洗脱体积 Ve(ml)	分子量 MW(dalton)
牛血清白蛋白 Serumalbumin	34	66,200
大豆胰蛋白酶抑制剂 Trypsin inhibitor	42	21,500
核糖核酸酶 A Ribonuclease A	57	13,700
马槟榔甜蛋白 Ⅰ Mabinlin Ⅰ	61	小于上述 less than above





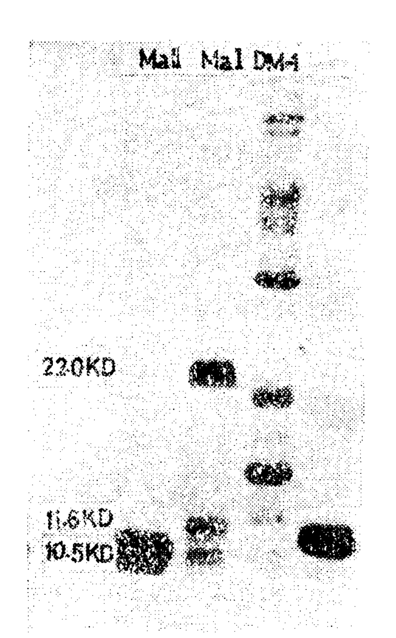


图11. MaⅠ，MaⅡ和MaⅠ热变性主产物DM-1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图及扫描曲线。照片中最右为DM-1。电泳条件均如文中所述。扫描波长595 nm；参考波长440 nm。

Fig. 11. SDS-PAGE pattern and electrophoretic diagram of Ma Ⅰ, Ma Ⅱ and DM-1. All conditions electrophoresis are described in the papeer. Scanning wavelength 595 nm; reference wavelength 440 nm. The right line of photo. is DM-1.

图12的结果表明，样品中的离子强度不影响22KD带的形成。

用前述脱掉变性剂的MaⅠ样品进行分析，发现22KD带仍然存在；但经盐酸胍处理后的样品与用尿素处理后的样品相比，22KD带很不明显（图4）。

若将MaⅠ热变性，则主要产物绝无22KD带出现（图11）。

若将MaⅠ还原变性，再经 Sephadex G-75 分离的样品进行 SDS 电泳分析，亦无22KD带（图13）；若再羧甲基化后经凝胶过滤分离，得到的样品也没有22 KD 带出现（图13）。

如果用SDS电泳样品液处理样品的时间增加到5分钟，则 22 KD 带全部消失（图14）。

MaⅡ无论在任何条件下进行SDS电泳分析，均不出现与22 KD带相类似的情况。

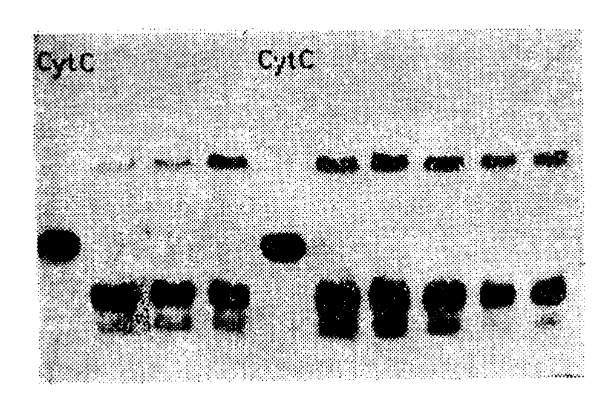


图12. 在不同离子强度的溶液中，马槟榔甜味蛋白质Ⅰ的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

从右到左，样品中的氯化钠浓度范围为0.25—0.4*M*。Cyt C表示参考蛋白马心细胞色素C。

Fig. 12. SDS-PAGE pattern of Ma Ⅰ in differnt ion strength solutions.

NaCl concentrations of samples in differnt sample channels were from 0.025*M* to 0.4*M* from right to left. Cyt C means reference protein cytochrome C from horse heart.

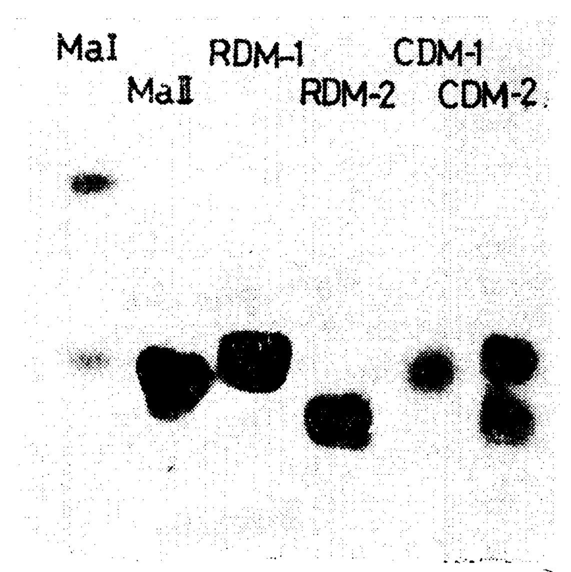


图13. 还原变性后的MaⅠ和羧甲基化后的MaⅠSDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

RDM-1和RDM-2表示还原变性后的MaⅠ经凝胶过滤分离后得到不同的组份；CDM-1和CDM-2表示羧甲基化后的MaⅠ经凝胶过滤分离后得到的不同组份。

Fig. 13. SDS-PAGE pattern of reduced aud denatured Ma Ⅰ and carboxymethylated MaⅠ. RDM-1 and RDM-2 mean different fractions of gel filtration of reduced and denatured MaⅠ; CDM-1 and CDM-2 mean different fractions of gel filtration oJ carboxymethylated Ma.Ⅰ.

Mabinlin Ⅱ
CytC
Mabinlin Ⅰ

图14. 经过长时间SDS-PAGE样品液处理后的MaⅠSDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Cyt C表示参考蛋白马心细胞色素C。

Fig. 14. SDS-PACE pattern of Ma Ⅰ after a onger time treatment with SDS-PAGE sample solution. Cyt C means reference protein cytochrome C from horse heart.

讨　论

从前述热变性试验中可看出，MaⅡ较MaⅠ的热稳定性要大得多。或者说，MaⅡ在经受长时间的高温处理后，一旦冷即，又能恢复其原有的构象。由此而使我们得到启发，如果能将MaⅡ应用到食品生产中去，则它基本能够承受象巴斯德消毒等一类的加工过程。当然，它是否和其它物质在一起时也不改变这种热稳定的特性，还需进一步验证。

在MaⅠ的热变性产物中除了主要的变性产物DM-1以外，还分离得到了DM-2和DM-3；经进一步实验发现其中含有一种苦味蛋白质，关于它的来源及性质拟另文讨论。

在变性剂变性的试验中，通过荧光发射谱的观察[4]，我们认为MaⅠ发生变性时，蛋白质的色氨酸发射峰移至372 nm。这种红移的发生，可能是变性剂导致了蛋白质主链构象的改变，从而使Try所处的环境发生改变的缘故[7]。以此为指标，发现MaⅠ在中性条件下3 M的盐酸胍就足以使它发生变性；但在酸性条件下，6 M的盐酸胍才能使它变性，说明在酸性条件下比较稳定，这和Monellin的情况比较相似。而即使是8 M的尿素，也不能使它完全变性，只能使Try发射峰发生轻微的红移；但在酸性条件下，8 M的尿素也不能使红移发生。

从MaⅡ的情况来看，在一般的中性条件下，6 M的盐酸胍使其Try发射峰移至370 nm。以此为指标则可见，5 M的盐酸胍就能使变性发生；而在pH为8时，4 M则可。但在酸性条件下，即使是6 M的盐酸胍也不能达到此。由此看来，碱性条件利于变性；同时MaⅡ比MaⅠ对变性剂的稳定性要强得多。这和热变性的结果是相符的。

当将用盐酸胍和尿素处理的MaⅠ脱掉变性剂后，甜味就可以恢复；而且圆二色谱及按Yang和Chen的方法计算的结果[3]（未发表）均表明α螺旋仍占据构象组成的相当部分；但与未用变性剂处理样相比有一些变化。这种变化盐酸胍处理样较明显。说明变性剂处理MaⅠ后，严格地说不能完全复性。

实验中还观察到，MaⅠ样品在还原变性处理不充分的条件下，在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳中出现22KD的二聚体带。在热变性、充分还原变性、SH基羧甲基化等情况下，22KD带均消失，与此同时，用于分析的样品甜味也消失了；当样品的甜味仍存在时，无论是样品中离子强度增大，还是经过了尿素或盐酸胍的处理，22KD带仍然存在。因此，很可能SDS对MaⅠ变性时，未使MaⅠ的高级结构完全破坏掉，还保留了一部分有利于MaⅠ分子形成一种亚稳定二聚体的特殊结构，而且这种结构与甜味有关。当MaⅠ分子被彻底变性后，这种结构也随之遭到破坏，因此二聚体就不能形成或被解离。这提示我们，在进行类似蛋白质的SDS电泳分析时，需要进行彻底的变性才能测得较准确的分子量。

MaⅡ在上述任何情况下均无类似于22KD带的电泳条带出现，说明MaⅡ可能无相应的特殊结构。这也为MaⅠ和MaⅡ结构及稳定性的不同提供了一些辅助证据。

参 考 文 献

〔1〕 胡忠、何敏，1983：云南植物研究，5（2）：207—212。
〔2〕 胡忠、彭丽萍、何敏，1985：云南植物研究，7（1）：1—10。
〔3〕 鲁子贤，1981：蛋白质化学，第84—128页，科学出版社。
〔4〕 Brand, J. K. and R. H. Cagan, 1977: *Biochemim. Biophys. Acta*, 493: 178—187.
〔5〕 Cagan, R. H. and I. A. Moris, 1978: Monellin, a sweet-testing protein. In: Sweetners and Dental Caries Feeding, Weoght obsity abstract (suppl.) pp. 311—322.
〔6〕 Creighton, T. E., 1979: *J. Mol.Biol.*, 129:235.
〔7〕 Kronman, M. J., 1976: Changes in emission band shape of proteins undergoing conformational changes. In:Biochemical fluorescence concepts, Vol. 2, edited by R. F. Chen and H. Edeiloch, pp. 483—513, Marcel Dekker, Inc., New York.
〔8〕 Laemmli, U. K., 1970:*Nature*, 227:680—685.
〔9〕 Reisfeld, R. A., U. J. Lewis and D. E. Williams, 1962:*Nature*, 195:281.

STUDIES ON MABINLIN, THE SWEET PROTEIN FROM SEEDS OF CAPPARIS MASAIKAI
Ⅳ. STABILITY AND DENATURATION

Ding Ming and Hu Zhong
(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract After a series of heating denaturation experiments, we found the sweetness of Ma I was irreversibly lost in incubating at 80 °C for 30 minutes, the α-helix of Ma I also disappeared totally and the PAGE behavior changed. But the sweetness of Ma Ⅱ wasn't lost at 80°C for 48 h incubation, and its PAGE behavior didn't change.

In denaturant tests, a bathochromic shift of Try fluorescence emission pack of Mabinlin happened along with the increasing of the concentration of denaturants untill the denaturation has been complete. By means of this indicator, we also found that in acidic condition Mabinlin was more stable; that 3—5 *M* Gdn-HCl was strong enough to denature Mabinlin; but even 8 *M* urea had a slight effect. This was a similar result as that of transverse urea-gradient electrophoresis. If the denaturants were removed, the sweetness of Ma Ⅰ might recover, the secondary structure and the PAGE behavior of Ma Ⅰ only altered slightly.

There was a dimer band of Ma Ⅰ in SDS-PAGE analysis. But after Ma I was thermodenatured, or denatured by DTE and Gdn-HCl or carboxymethylated on its SH groups, etc., the dimer band disappeared in the gel as the loss of the sweetness of Ma I. In case of Ma Ⅱ, the dimer band never appeared when any method mentioned above was used. The formation of dimer band might be due to the specific structure fo Ma I that related to its sweetness.

Key words *Capparis masaikai*; Sweet protein; Denaturation